



Dr hab. n. med. Anna Wójcicka
Zakład Medycyny Genomowej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa, tel. 22 599 21 89

Warszawa, 10 września 2018

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Elżbiety Sokół pt. „Różnicowe składanie rejonów 3'UTR czynników splicingowych SRSF1, SRSF2 i hnRNP A1 w kontekście regulacji ich ekspresji przez mikroRNA w raku nerkowokomórkowym typu jasnokomórkowego”.

Przedstawiona mi do oceny praca, wykonana w Zakładzie Biochemii i Biologii Molekularnej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, dotyczy roli mikroRNA w regulacji ekspresji genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy składania pierwotnego transkryptu (tj. czynniki splicingowe). Projekt jest kontynuacją dotychczasowych badań Zespołu, prowadzonych na modelu raka nerkowokomórkowego typu jasnokomórkowego (ccRCC), w których wykazano, że w ccRCC dochodzi do deregulacji poziomu czynników splicingowych oraz do zaburzeń ekspresji licznych mikroRNA. Umożliwiło to podjęcie dalszych badań, przedstawionych w recenzowanej pracy doktorskiej, dotyczących analizy wpływu mikroRNA na ekspresję czynników splicingowych oraz określenia roli tego procesu w patogenezie ccRCC.

Wyniki, które zostały uzyskane i podsumowane w pracy przez Panią mgr Sokół, są rezultatem szeroko zakrojonego projektu badawczego, wymagającego zastosowania szeregu indywidualnie dobranych metod analiz *in silico*, *in vitro* i *in vivo*. Nie ulega wątpliwości, że realizacja projektu wymagała od Doktorantki ogromnego zaangażowania i niebagatelnych nakładów pracy laboratoryjnej. Ponadto, ponieważ projekt porusza tematykę związaną z różnymi etapami ekspresji genów (działanie mikroRNA, składanie pierwotnego transkryptu), jego przeprowadzenie, podsumowanie i opisanie wymagało szerokiej znajomości tematu, co zasługuje na uznanie.

Przedstawiona mi do oceny praca została zredagowana w sposób typowy: na 129 stronach zamieszczonych zostało 6 przejrzyste skonstruowanych rozdziałów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazy rycin, tabel i skrótów. W pracy zawarte zostały ponadto informacje na temat dorobku publikacyjnego Doktorantki; dołączono także publikację, która powstała w wyniku realizacji projektu doktorskiego. We wstępie Pani mgr Sokół w sposób wyczerpujący podsumowała aktualną wiedzę dotyczącą tematyki pracy, popartą cytowaniami aktualnej literatury. Cele pracy zostały skonstruowane przejrzyste i znalazły odzwierciedlenie w otrzymanych wynikach. Wykorzystane w projekcie metody zostały opisane bardzo szczegółowo, co dowodzi doskonałego warsztatu i jednoznacznie udowadnia, jak trudne i czasochłonne było osiągnięcie postawionych w projekcie założeń badawczych. Na uznanie zasługuje fakt, że w doświadczeniach związanych z analizą oddziaływaniem mikroRNA z 3'UTR badanych genów wykorzystano także konstrukty z mutacją

w miejscu wiązania badanych cząsteczek. Jest to czasochłonne podejście, niejednokrotnie pomijane nawet w bardzo dobrych pracach i projektach. Wiem także, jak niezwykle trudna jest identyfikacja i analiza nowych transkryptów (wariantów splicingowych) genów, a w wykonaniu Pani mgr Sokół doświadczenia te wydają się proste.

Równocześnie jednak w trakcie czytania narzuca się myśl, że praca byłaby równie dobra i wyczerpująca, gdyby Doktorantka zrezygnowała z opisywania badań nad regulacją genu *SRSF2* (które są w pracy cząstkowe). Pragnę także zauważyć, że w pracy zawarto wyniki doświadczeń ukierunkowanych na analizę stabilności i degradacji transkryptów, co nie znalazło odzwierciedlenia w celach pracy. Nie są to jednak uwagi krytyczne: rozumiem klęskę urodzaju i to, że nie jest łatwo porzucić ciekawe wyniki, które udało się otrzymać w efekcie ciężkiej pracy.

Ponieważ spotkał mnie zaszczyt i przyjemność recenzowania pracy doktorskiej mgr Sokół, chciałabym skorzystać z przywileju recenzentki i prosić Doktorantkę o udzielenie odpowiedzi zawarte poniżej pytania, co pozwoli mi lepiej zrozumieć pewne założenia projektu. Przy okazji pozwalam sobie przekazać kilka drobnych uwag odnośnie tekstu pracy; uwagi te nie wymagają jednakże komentarza:

1. We Wstępie Doktorantka pisze, że „rozpowszechniona w raku nerkowokomórkowym typu jasnokomórkowego hipometylacja DNA” związana jest z mutacjami genu metylotransferazy SETD2 oraz genach kompleksu remodelującego chromatynę. Chciałabym krótko usłyszeć, w jaki sposób zaburzenia funkcji metylotransferaz histonowych (do których należy SETD2) przekładają się bezpośrednio na zaburzenia procesu metylacji DNA.

2. Jak Doktorantka definiuje „zachorowalność” na daną chorobę? Odniesienie do zachorowalności na ccRCC znajduje się na stronie 17 pracy.

3. Czy wg Doktorantki 3'UTR jest fragmentem genu, transkryptu czy białka? W tekście pracy brakuje kursywy w oznaczeniach genów.

4. Zastanawia mnie kolejność wykonania doświadczeń, bądź też opisanie ich w pracy. Zazwyczaj analizy zaczyna się od wykazania, czy dane mikroRNA wiąże się z 3'UTR badanego genu w systemie lucyferazowym. W przedstawionej pracy wpieryw wykazano wpływ mikroRNA na poziom endogennych transkryptów genów, dopiero później oceniono, czy regulacja mikroRNA::mRNA zachodzi poprzez bezpośrednie oddziaływanie. Chciałabym usłyszeć, dlaczego takie podejście wydało się Doktorantce najwłaściwsze?

5. Dyskutując otrzymane wyniki, Doktorantka szeroko opisała biologiczną rolę miR-10b-5p i miR-203a-3p. Chciałabym jednak usłyszeć, jak wyjaśni fakt, że miR-1-3p, miR-136-5p i miR-206 nie wiążą się z 3'UTR genu *SRSF1*, ale obniżają poziom białka i mRNA *SFRS1* w linii Caki-2?

6. Analogicznie do pytania powyżej: Doktorantka wykazała, że miR-206 powoduje obniżenie endogennych produktów genów *HNRNPA1* i *SRSF1*, co byłoby ciekawym, plejotropowym działaniem. Jakie mogą być jego mechanizmy i biologiczny efekt?

6. W pracy zostało wykazane, że na matrycy genu *SRSF1* powstaje kilka izoform mRNA, zawierających różne warianty 3'UTR. Wszystkie te warianty ulegają zwiększonej ekspresji w ccRCC. Czy Doktorantka podjęła próbę sprawdzenia, czy badane przez Nią mikroRNA, dla których nie wykazała wiązania z główną formą 3'UTR *SRSF1* (np. miR-200c-3p, miR-206) wiążą się do nowo zidentyfikowanych wariantów w systemie lucyferazowym? Czy takie zjawisko mogłoby odpowiadać za obserwowany w pracy wpływ na poziom mRNA i białka tego czynnika splicingowego?

7. Interesujące są wyniki wskazujące na zwrotną regulację, zachodzącą pomiędzy *SRSF1* i miR-10b-5p. Wyciszenie ekspresji genu *SRSF1* prowadziło do obniżenia poziomu cząsteczki mikroRNA miR-10b-5p,

zastanawia mnie zatem, czy Doktorantka podjęła próbę sprawdzenia, czy podobny efekt zachodzi po transfekcji komórek innymi mikroRNA, które także obniżają poziom mRNA i białka SRSF1?

8. W badaniach nad wpływem mikroRNA na ekspresję genu *HNRNPA1* wykorzystano mikroRNA, których poziom w ccRCC jest obniżony, ale także 2 cząsteczki, których poziom w ccRCC rośnie: co leżało u podstaw takiego podejścia, szczególnie, że w genie *HNRNPA1* Doktorantka zidentyfikowała jedynie 1 izoformę 3'UTR. W pracy brakuje mi informacji na temat poziomu mRNA/białka hnRNPA1 w wycinkach ccRCC i kontrolnych.

9. Jaka według Doktorantki jest biologiczna rola nowo odkrytych transkryptów genu *SFRS1*? Czy poziom ich ekspresji jest wystarczający, by pełniły w komórkach istotną rolę?

Z góry dziękując za odpowiedzi na powyższe pytania, poniżej zamieszczam kilka drobnych uwag dotyczących tekstu pracy:

1. Streszczenie zawiera bardzo rozbudowany opis aktualnej wiedzy na temat podejmowanego zagadnienia, nie zawiera jednak wielu istotnych danych na temat wykorzystanych materiałów i metod oraz uzyskanych wyników.

2. Spójniki lub i albo nie są wymienne: ten drugi jest związany z alternatywą wykluczającą. Przy zdaniach typu „komórki transfekowałam syntetycznymi cząsteczkami mikroRNA miRNA mimik lub miRNA inhibitor lub odpowiednimi cząsteczkami kontrolnymi” (np. strona 42, 52) warto było pewnie użyć spójnika „albo”, by podkreślić, że cząsteczki nie były dodawane do komórek łącznie, tylko zawsze osobno. Być może jednak się mylę?

3. Na stronie 22 znalazło się dość niezręczne sformułowanie „Autoregulacja swojej ekspresji”.

4. Przy podawaniu regionu chromosomalnego badanych sekwencji, warto podać genom referencyjny, do którego te dane się odnoszą. Każda zmiana bazy powoduje, że obszar będzie nieidentyfikowalny.

Podsumowując swoją recenzję, chciałabym wyrazić uznanie dla ogromu zaangażowania i wysiłku, włożonego w realizację i podsumowanie pracy doktorskiej. Gratuluję Doktorantce oraz obu Paniom Promotor, których doświadczenie i warsztat naukowy stały u podstaw tego szeroko zakrojonego projektu. Mam przyjemność stwierdzić, że rozprawa Pani magister Elżbiety Sokół spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i stawiam wniosek o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie.

